キッコーマン微生物検査キット

「ルシフェール HS セット」取扱い説明書

商品コード：60315

注意！

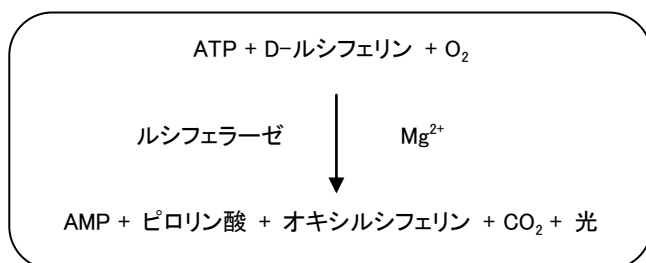
1. キット中の試薬を飲んだり、素手で触れたり、目に入れたりしないでください。
2. 取扱い説明書の使用上の注意および取扱い上の注意に従って取扱ってください。

「ルシフェール HS セット」は、キッコーマンのバイオ技術によって開発された、微生物検査キットです。

〔用途〕

本製品は、微生物測定に使用することができます。

〔測定原理〕

ホタルルシフェラーゼは、以下の反応により光を発します。

反応の結果生じる光の量は ATP（アデノシン三リン酸）量に比例するので、発光量を測定することにより ATP を定量することができます。

ATP は微生物を始めとする生細胞にエネルギー物質として含まれています（細胞内 ATP）。また、生細胞中だけでなく、食品や食品残渣などにも ATP（細胞外 ATP）が多量に含まれています。細胞あたりの ATP 量はほぼ一定なので、細胞外 ATP を消去した後に細胞内 ATP のみを測定することにより、生細胞数を推定することができます。

本製品は細胞外 ATP の消去に用いる ATP 消去試薬と、細胞内 ATP 抽出用の試薬および高感度発光試薬を組み合わせた製品です。 ATP 消去試薬は細胞外 ATP を非常に効率よく消去することができます。高感度発光試薬 HS は、姉妹品ルシフェール 250 プラスより約 20 倍高い発光量が得られるよう調整されています。これらを組み合わせることにより、高感度な微生物測定が実施できるようになりました。

〔キットの構成〕

本製品は以下の試薬より構成されています。

試薬名	主成分	数量
発光試薬 HS	ルシフェリン ルシフェラーゼ 酢酸マグネシウム	凍結乾燥品 2 本
発光試薬溶解液	Tricine 緩衝液	5.5 mL 2 本
ATP 抽出試薬	界面活性剤	5.5 mL 2 本
ATP 消去試薬	ATP 分解酵素 MES 緩衝液	凍結乾燥品 2 本
ATP 消去試薬溶解液	MES 緩衝液	5.5 mL 2 本

〔使用上の注意〕

本製品の性能を十分に活用していただくため、以下の点にご注意ください。

①品質保持期限が切れた製品は使用しないでください。測定が正確に行えないおそれがあります（品質保持期限は外箱に記載してあります）。

②必ず推奨機器を用いて発光量を測定してください。推奨機器以外を使用しますと、測定が正確に行えないおそれがあります。

③本製品は室温（20～30℃）に戻してからご使用ください。冷えたままで使用しますと、測定値が低くなることがあります。

④発光試薬 HS および ATP 消去試薬は凍結乾燥後、陰圧下で封栓してあります。ゴム栓を強い力で開けますと、急激に空気が入り込み、内容物が飛散するおそれがありますので、試薬の調製法に従って開栓してください。

⑤ルミチューブやルミテスターが静電気を帯びますと、異常値を示す場合があります。そのような場合は、ルミチューブやルミテスターを湿った布で拭くなどして、静電気を取り除いてください。

⑥使用時は検査用手袋などを着用してください。また、<u>手袋は抗静電性のもの（例えばニトリルゴム製）を使用し、手袋をはめた手でルミチューブをこすらないように気を付けてください。</u>素手で使用しますと ATP や微生物の混入によりブランク値が上昇し、測定が正確に行えないおそれがあります。

⑦ルミテスターを使用時に、周辺に電気ノイズ（電子レンジ、ミキサーなどが原因となります）が発生しますと、異常値を示すことがあります。周辺に電気ノイズを発生する機器類等が無いことをご確認のうえ、ご使用ください。

⑧異なるロット（試薬瓶ラベルに記載）の試薬を混合して使用しないでください。測定が正確に行えないおそれがあります。

⑨マイクロピペットチップは滅菌済みのもの、または検査用手袋などを着用した上でラックに並べオートクレーブしたものをご使用ください。ATP や微生物が混入するとブランク値が上昇し、測定が正確に行えないおそれがあります。

⑩本製品をご使用の際は、容器本体の口やキャップの先端に触らないように注意してください。ATP や微生物が混入するとブランク値が上昇し、測定が正確に行えないおそれがあります。

⑪ATP 消去試薬で処理した後に残存する細胞外 ATP 量は、試料の種類によって異なります。残存する細胞外 ATP 量は、"〔測定方法〕5）測定例 ①例1：残存細胞外 ATP 量の測定"で示した手順に従って測定してください。

⑫ATP 消去試薬で処理した後は 15 分以内に発光量を測定してください。測定が正確に行えないおそれがあります。

⑬ATP 消去反応中は反応を行っているチューブをラップなどで覆ってください。反応液中にほこりや微生物が混入しますと、測定が正確に行えないおそれがあります。

⑭本製品による発光は急速に減衰します（発光開始 1 分間で約 50％減衰します）。発光試薬添加後は、ミキサーなどで良く攪拌した上で 10 秒以内に発光量の測定を開始してください。測

定が正確に行えないおそれがあります(発光の経時変化を図1に示します)。

⑮ATP の抽出に必要な時間は、微生物の種類によって異なります(通常は 20 秒で充分です)。正確な測定を行うには、最適時間を求めて一定時間に固定してください。

⑯微生物の種類によっては懸濁された溶液中で飢餓状態となり、ATP の含量が急激に低下することがあります。その場合は、目的とする微生物に適した溶液を用いて測定試料を調製してください。例えば、グルコースやショ糖など糖類の添加が有効です。

⑰微生物測定を行う際に使用する検量線は、微生物の種類や用いる培地の組成など使用条件により異なります。必ず使用する条件下で作成した検量線をご使用ください。

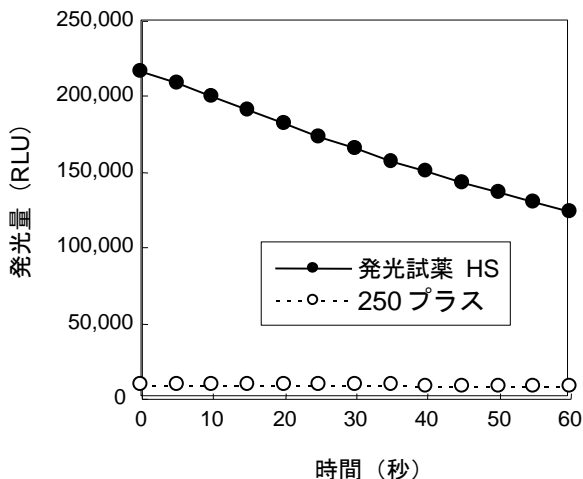



図 1 発光の経時変化

〔測定に使用する推奨機器〕

ルミテスター C-110、C-100N、C-100
(販売元:キッコーマンバイケミファ(株))

〔試薬の調製法〕

1. 発光試薬 HS

発光試薬 HS は凍結乾燥後、陰圧下で封栓してあります。内容物が飛散しないようにゆっくりとゴム栓を持ち上げ、切り込み部分から空気を入れるようにして開栓してください。開栓した発光試薬 HS 1 瓶に 1 瓶分の発光試薬溶解液を全量移し入れ、室温で 5 分程度放置後、泡立たない程度に攪拌して溶解してください(発光試薬溶解液は稀に若干の濁りを生じる場合がありますが、品質には影響がございませんので、そのままご使用ください)。溶解した発光試薬は、一度で使い切ることをお勧めします。

止むを得ず保存する場合は、冷蔵(2~8℃)または凍結(-10℃以下)してください。ただし、保存後の発光試薬は発光量が低下していますので、別売りの ATP 標準試薬セット(キッコーマンバイケミファ(株)製、商品コード:60260)を使って ATP の検量線を新たに作成した上でご使用ください。保存期間は、冷蔵(2~8℃)で 1 週間、凍結(-10℃以下)で 1 ヶ月間、凍結融解は 3 回を限度としてください。

2. ATP 消去試薬

ATP 消去試薬は凍結乾燥後、陰圧下で封栓してあります。内容物が飛散しないようにゆっくりとゴム栓を持ち上げ、切り込み部分から空気を入れるようにして開栓してください。開栓した消去試薬 1 瓶に 1 瓶分の ATP 消去試薬溶解液を全量移し入れ、室温で 5 分程度放置後、泡立たない程度に攪拌して溶解してください。溶解した ATP 消去試薬は、一度で使い切ることをお勧めします。

止むを得ず保存する場合は、冷蔵(2~8℃)または凍結(-10℃以下)してください。保存期間は、冷蔵で1週間、凍結で1ヶ月間、凍結融解は 3 回を限度としてください。

3. ATP 抽出試薬

開栓してそのままご使用ください。一度で使い切ることをお勧めしますが、止むを得ず保存する場合は冷蔵(2~8℃)で保存してください。 ATP や微生物の汚染がない限り、1 ヶ月間保存できます。

〔測定方法〕

1) 本製品の他に準備する器具および試薬

ルミノメーター(ルミテスター C シリーズ)、ルミチューブ(販売元:キッコーマンバイケミファ(株)、商品コード:60183)、マイクロピペット、滅菌済みマイクロピペットチップ

2) 測定試料の調製

①固形試料の場合:

ストマッカー、ホモジナイザーなどで試料を処理し、上澄み液を測定に供します。

②液状試料の場合:

透明液の場合はそのまま、汚濁液、着色液を含む試料の場合は、緩衝液又は蒸留水で適宜希釈して測定に供します。

上記の手順で調製した試料中には細胞外 ATP と生細胞が混在しています。細胞外 ATP のみを測定するには、0.22μm のフィルターで試料をろ過して用いてください。

3) 細胞外 ATP の消去

ルミチューブに試料 1.0mL を採取します。そこに 0.1mL の ATP 消去試薬を添加し、ミキサーなどで良く攪拌します。そのうち 0.1mL を別のルミチューブに採取し、良く攪拌後、ラップなどでルミチューブを覆って室温にて 30 分間反応させます。

4) 発光測定

反応終了後のルミチューブに 0.1mL の ATP 抽出試薬を添加し、20 秒後に 0.1mL の発光試薬を添加します。ミキサーなどで数秒攪拌した上で 10 秒以内にルミテスターにて発光量(RLU: Relative Light Unit)の測定を開始します。

5) 測定例

①例 1:残存細胞外 ATP 量の測定

測定例として、各種培地中の細胞外 ATP 量を測定した結果を示します。ブレインハートインフュージョン(BHI)培地、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト(SCD)培地、普通ブイヨン(NB)培地およびチオグリコール酸培地Ⅱ(TGCⅡ)を培地使用法に従って調製し、測定試料として用いました。上記方法に従って細胞外 ATP 量を消去し、発光量を測定しました(表1)。

表 1 各種培地の細胞外 ATP 量

試 料	発光量 (RLU)	
	未処理	ATP 消去後
BHI 培地	3,290	45
SCD 培地	60,300	66
NB 培地	16,092	23
TGC Ⅱ 培地	25,164	42

未処理の培地中の細胞外 ATP 量は培地の種類によって異なり、SCD 培地で最も高い 60,300 RLU もの発光量が得られました。一方、ATP 消去後の細胞外 ATP 量はいずれの培地においても 66 RLU 以下となり、大幅に低下しました。

②例 2：微生物測定

測定例として *E. coli* ATCC 25922 の検量線を図 2 に示します。普通ブイヨン培地での一晩培養液を無菌の普通ブイヨン培地で希釈し、10 倍希釈系列を作製しました。発光量の測定は、 ATP 消去試薬を用いて前処理を行った後、上記方法に従って測定しました。微生物数（CFU: Colony Forming Units）は、標準寒天培地を用いた混釈培養により 35℃で 48 時間培養し、生じたコロニー数から算出しました。両測定値の間には 10^2CFU/mL のオーダー以上で良好な直線関係が認められました。

微生物測定を行う際に使用する検量線は、微生物の種類や用いる培地の組成など使用条件により異なります。必ず使用する条件下で作成した検量線をご使用ください。

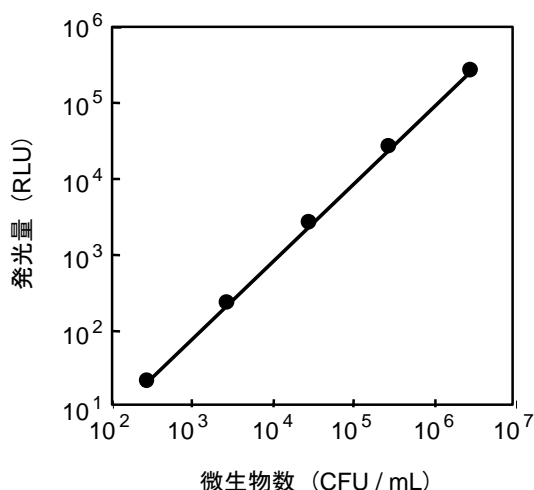



図 2 *E.coli* の検量線

〔廃棄の方法〕

発光試薬 HS、発光試薬溶解液、ATP 消去試薬および ATP 消去試薬溶解液の容器はガラス、ゴム、アルミの材質からなっています。ATP 抽出試薬の容器は、本体、キャップともポリプロピレン製です。廃棄の際は各々を分別して、都道府県・市町村が定める廃棄物の適正処理に従って廃棄処理してください。

〔取扱い上の注意〕

本製品を安全にご使用いただくため、以下の点にご注意ください。

①本製品を微生物測定の目的以外には使用しないでください。本製品は、微生物を特定する検査などにはご使用できません。

②本製品は ATP 法を用いた迅速測定キットであり、本製品を用いて正確な一般生菌数を求めることはできません。一般生菌数を正確に測定する際は、食品衛生検査指針で定める測定法に従って測定してください。

③本製品の試薬類を使用前後に口に入れたり、素手で触れたり、目に入れたりしないでください。口に入れた場合は口を良くすすいだ後、皮膚についた場合は大量の水で洗浄した後、また目に入れた場合は大量の水で洗浄した後、直ちに医師に連絡を取り、指示を受けてください。

④本製品の容器および試薬が食品などへ混入しないよう、保管、廃棄に充分ご注意ください。

⑤本製品の ATP 抽出試薬にはアルカリ性（pH12.0）の試薬を用いています。取扱いにはくれぐれもご注意ください。

⑥本製品は幼児の手の届かないところに保管してください。

〔保存方法〕

1) キットの保存：冷暗所（2～8℃）にて保存。

2) 試薬開栓後の保存：発光試薬、ATP 消去試薬および ATP 抽出試薬ともに開栓後は一度で使いきることをお勧めします。止むを得ず保存する場合、発光試薬および ATP 消去試薬は冷蔵（2～8℃）または凍結（-10℃ 以下）してください。ただし、保存後の発光試薬は発光量が低下していますので、別売りの ATP 標準試薬セット（商品コード：60260）を使って ATP の検量線を新たに作成した上でご使用ください。保存期間は、冷蔵（2～8℃）で 1 週間、凍結（-10℃以下）で 1 ヶ月間、凍結融解は 3 回を限度としてください。ATP 抽出試薬は、冷蔵（2～8℃）で 1 ヶ月間の保存を限度としてください。

3) 品質保持期限：本製品の外箱に記載。

〔保証〕

製造元では、本製品が所期の品質を有することおよび、本製品に不具合があった場合代替の製品を提供することを保証しますが、それ以外の保証は致しません。製造元は、特別な若しくは結果として生じる損害または、本製品の使用から直接的または間接的に生じる費用を含むいかなる損害にも責任は負いません。

製造元 **キッコーマンバイオケミファ株式会社**
〒105-0003 東京都港区西新橋 2-1-1
Tel: 03-5521-5490 Fax: 03-5521-5498
E-mail: biochemifa@mail.kikkoman.co.jp
URL: http://biochemifa.kikkoman.co.jp/